

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 251**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2015 PCT/IB2015/000726**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15114469**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2015 E 15738466 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 3094753**

54 Título: **Secuencia cubierta de conversión de ADN y métodos de detección**

30 Prioridad:

15.01.2014 US 201461927710 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.04.2020

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (50.0%)
100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064, US y
TOKYO INSTITUTE OF TECHNOLOGY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KOMIYA, KEN;
KOMORI, MAKOTO y
YOSHIMURA, TORU**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 754 251 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Secuencia cubierta de conversión de ADN y métodos de detección

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica la prioridad a la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. con el número de serie 61/927.710, presentada el 15 de enero de 2014.

10 **Antecedentes**

La detección de un ácido nucleico diana en muestras de ensayo es importante en distintos campos, incluyendo la medicina y la biología. Hay disponibles muchas composiciones y procedimientos para la detección de moléculas de ácido nucleico específicas. Normalmente, esta tecnología se basa en una hibridación dependiente de la secuencia entre un ácido nucleico diana y una sonda de ácido nucleico que puede variar en longitud desde oligonucleótidos cortos (de 20 bases o menos) a muchas kilobases (kb).

Un método que se utiliza ampliamente para la amplificación de secuencias específicas desde dentro de una población de secuencias de ácido nucleico es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En una reacción de PCR típica, se amplifica un ácido nucleico diana en tres etapas distintas: una disociación (desnaturalización) de una matriz de ADN de cadena doble en cadenas sencillas; la hibridación de los cebadores a los ADN matrices de cadena sencilla; y la síntesis (extensión) de una cadena complementaria de partir de cada cebador. Durante la PCR, el procedimiento de desnaturalización, el procedimiento de hibridación, y el procedimiento de extensión se llevan a cabo cada uno a diferentes temperaturas y se repiten cíclicamente a través de diferentes temperaturas de reacción con un termociclador. En consecuencia, es necesario un caro equipo de control de la temperatura para llevar a cabo dicha reacción que evita su uso rutinario en exámenes de campo, en el diagnóstico *in situ* (a pie de cama), y exámenes baratos.

Además, como la reacción PCR se lleva a cabo a tres temperaturas diferentes, la reacción se asocia con desafíos tales como la dificultad de mantener las temperaturas con precisión y que aumente la pérdida de tiempo en proporción con el número de ciclos. Además, la desnaturalización de una matriz de ADN de doble cadena en cadenas sencillas necesita el uso de altas temperaturas, que necesita que la reacción se lleva a cabo utilizando un número limitado de ADN polimerasas termoestables.

El documento US 5 958 700 desvela un método para la detección de ácidos nucleicos mediante activación de fluorescencia en el que se utilizan oligonucleótidos horquillados detectores que comprenden sitios de reconocimiento de la endonucleasa de restricción y marcadores de fluorescencia. La polimerasa que se utiliza para la reacción tiene una actividad de desplazamiento de la cadena y carece de actividad exonucleasa 5' a 3'.

El documento WO 2012/077819 desvela métodos y los productos correspondientes para la detección de ácidos nucleicos diana con el uso de un oligonucleótido que comprende en la dirección desde 5' a 3', una primera secuencia arbitraria, un sitio de reconocimiento de la endonucleasa que se utiliza en una reacción de mellado y una secuencia complementaria del ácido nucleico diana.

En consecuencia, la siguiente divulgación proporciona métodos alternativos y composiciones para la detección de un ácido nucleico (tal como ADN o ARN) en condiciones de reacción que son menos rigurosas que las que se utilizan en la PCR, a la vez que se mantiene la selectividad y sensibilidad adecuada para permitir la detección de moléculas de ácido nucleico que tienen una longitud corta y a bajas concentraciones. Entre otros aspectos, la presente divulgación proporciona nuevos métodos y moléculas de ácido nucleico que pueden mejorar el límite de detección de ácidos nucleicos diana en una muestra en condiciones a baja temperatura, isotérmicas, y puede simplificar o mejorar la preparación de muestras y métodos automáticos de detección.

Sumario de la invención

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra, dicho método comprende poner en contacto dicha muestra con: un oligonucleótido horquillado que comprende en la dirección 5' a 3', una primera secuencia arbitraria, un sitio de reconocimiento de la endonucleasa, una secuencia complementaria de dicha primera secuencia arbitraria, una secuencia complementaria del extremo 3' de un ácido nucleico diana, una modificación del extremo 3' que evita el inicio de reacciones de extensión no específicas a partir del extremo 3' del oligonucleótido horquillado; una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de mellado. En realizaciones de este aspecto, el método comprende también la determinación de la presencia o ausencia de un ADN de señal, donde la presencia del ADN de señal indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra.

En realizaciones de este aspecto, la polimerasa puede tener una actividad de desplazamiento de la cadena. En realizaciones adicionales, la polimerasa puede ser deficiente en exonucleasa 3' a 5', deficiente en exonucleasa 5' a 3', o ambas, deficiente a exonucleasa 3' a 5' y deficiente en exonucleasa 5' a 3'. En algunas realizaciones, la

polimerasa comprende una ADN polimerasa.

En realizaciones, la endonucleasa puede comprender una endonucleasa de mellado o una endonucleasa de restricción que se puede utilizar en una reacción mella un oligonucleótido.

5 Los aspectos y realizaciones relacionadas con el método descrito en el presente documento se pueden llevar a cabo en condiciones isotérmicas o bajo temperaturas sustancialmente constantes. En realizaciones adicionales, el método se puede llevar a cabo a temperaturas por debajo de las temperaturas utilizadas en los métodos de PCR convencionales. A modo de ejemplo, algunas realizaciones del método pueden llevarse a cabo a temperaturas de o por debajo de la temperatura de fusión de la estructura horquillada en un oligonucleótido (por ejemplo, un CSC ADN, tal como se ilustra en la representación ejemplar de la Figura 1). En algunas realizaciones, el método se puede llevar a cabo a una temperatura de o por debajo de una temperatura óptima de hibridación o anillado, o una temperatura de hibridación o anillado óptima calculada, o una temperatura de hibridación o anillado determinada experimentalmente, del ácido nucleico diana (T) y el oligonucleótido desvelado en el presente documento (por ejemplo, el CSC ADN). En realizaciones, el método se puede llevar a cabo a una temperatura que está por debajo de la temperatura de fusión del ácido nucleico (T) unido al oligonucleótido desvelado en el presente documento (por ejemplo, el CSC ADN). En otras realizaciones más, el método se puede llevar a cabo a temperaturas que permitan la actividad de la polimerasa y/o endonucleasa. En realizaciones adicionales, el método se puede llevar a cabo a temperaturas que están en o aproximadamente la temperatura de reacción óptima para la polimerasa y/o endonucleasa presente en la mezcla de reacción para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un oligonucleótido (o una secuencia cubierta de conversión de ADN o CSC ADN) que comprende una estructura horquillada, donde el oligonucleótido comprende en la dirección 5' a 3', una primera secuencia arbitraria, un sitio de reconocimiento de endonucleasa, una secuencia complementaria de dicha primera secuencia arbitraria, una secuencia complementaria del extremo 3' de un ácido nucleico diana, y una modificación en el extremo 3' que evita el inicio de reacciones de extensión específicas desde el extremo 3' del oligonucleótido horquillado, donde al menos una parte de dicha primera secuencia arbitraria y al menos una parte de dicha secuencia complementaria con dicha primera secuencia arbitraria se hibridan para formar dicha estructura horquillada. En algunas realizaciones de este aspecto, el sitio de reconocimiento de la endonucleasa se localiza en el bucle de dicha estructura horquillada. En algunas realizaciones, el sitio de reconocimiento de la endonucleasa comprende una secuencia que es complementaria de una secuencia que está mellada por una endonucleasa. En otras realizaciones, la secuencia que está mellada por la endonucleasa está adyacente (corriente abajo o corriente arriba) de la secuencia que es reconocida específicamente por la endonucleasa. La secuencia del ácido nucleico diana puede ser cualquier secuencia de nucleótidos de interés y en algunas realizaciones puede comprender una secuencia que se origina de un agente infeccioso o un microARN. En otras realizaciones, el ácido nucleico diana comprende una secuencia de un gen que se puede asociar con una enfermedad o trastorno.

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a una composición para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicha composición: un oligonucleótido que comprende una estructura horquillada, donde el oligonucleótido comprende en la dirección 5' a 3', una primera secuencia arbitraria, un sitio de reconocimiento de la endonucleasa, una secuencia complementaria de dicha primera secuencia arbitraria, una secuencia complementaria del extremo 3' de un ácido nucleico diana, y una modificación en el extremo 3' que evita el inicio de reacciones de extensión específicas desde el extremo 3' del oligonucleótido horquillado, donde al menos una parte de dicha primera secuencia arbitraria y al menos una parte de dicha secuencia complementaria de dicha primera secuencia arbitraria se hibridan para formar dicha estructura horquillada. Las composiciones también pueden comprender una polimerasa, y/o una endonucleasa capaz de mellar en o adyacente al sitio de reconocimiento de la endonucleasa el oligonucleótido cuando el sitio de reconocimiento de la endonucleasa es de doble cadena. Las composiciones también pueden incluir otros reactivos tales como tampones de reacción, desoxirribonucleótidos y moléculas indicadoras tales como, por ejemplo, sondas de ADN modificadas con un fluoróforo (por ejemplo, sondas baliza) para la detección fluorescente del ADN recién sintetizado.

Un kit para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho kit: una estructura horquillada, donde el oligonucleótido comprende en la dirección 5' a 3', una primera secuencia arbitraria, un sitio de reconocimiento de endonucleasa, una secuencia complementaria de dicha primera secuencia arbitraria, una secuencia complementaria del extremo 3' de un ácido nucleico diana, y una modificación en el extremo 3', donde al menos una parte de dicha primera secuencia arbitraria y al menos una parte de dicha secuencia complementaria de dicha primera secuencia arbitraria se hibridan para formar dicha estructura horquillada. Los kits pueden comprender adicionalmente una polimerasa y/o una endonucleasa capaz de mellar un sitio de reconocimiento de endonucleasa o un sitio adyacente al sitio de reconocimiento de la endonucleasa. Las composiciones también pueden incluir otros reactivos tales como tampones de reacción, desoxirribonucleótidos y moléculas indicadoras tales como, por ejemplo, sondas de ADN modificadas con un fluoróforo (por ejemplo, sondas baliza) para la detección fluorescente del ADN recién sintetizado. Los kits pueden comprender también instrucciones de uso en la práctica de uno cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento.

65 Los métodos, oligonucleótidos, y composiciones desveladas en el presente documento se pueden utilizar en combinación con plataformas de sistemas integrados. Por ejemplo, los métodos, oligonucleótidos, y composiciones

de la presente invención se pueden utilizar en combinación con un sistema ARCHITECT de Abbott. Los métodos, oligonucleótidos, y composiciones desveladas en el presente documento se pueden utilizar con plataformas de sistemas de preparación de muestras tales como, por ejemplo, el sistema de preparación de muestras m2000sp (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL). De manera similar, los métodos, oligonucleótidos, y composiciones desveladas en el presente documento se pueden utilizar con plataformas de sistemas *in situ* tales como, por ejemplo, el sistema *in situ* i-STAT de Abbott (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL). Adicionalmente, los métodos, oligonucleótidos, y composiciones de la presente invención se pueden utilizar con cualquiera de otros dispositivos, plataformas de ensayo e instrumentación tales como, por ejemplo, detecciones de fluorescencia mantenidas a mano, micrómetros de pH, dispositivos de microfluidica, micromatrices, sistemas de detección enzimática, tiras inmunocromatográficas, y dispositivos de flujo lateral.

Los métodos, oligonucleótidos, y composiciones descritas en el presente documento se pueden utilizar en el campo del diagnóstico molecular, incluyendo el diagnóstico de enfermedades infecciosas y no infecciosas. Por ejemplo, los métodos, oligonucleótidos, y composiciones de la presente invención se pueden utilizar para detectar microARN (miARN) asociados con enfermedades humanas. Ejemplos no limitantes de miARN incluyen el hsa-miR-24 (SEQ ID NO: 26) hsa-miR-107 (SEQ ID NO: 27) hsa-miR-21 (SEQ ID NO: 23) hsa-miR-500 (SEQ ID NO: 29) hsa-miR-106a (SEQ ID NO: 30) hsa-miR-221 (SEQ ID NO: 28). De manera similar, los métodos, oligonucleótidos, y composiciones de la presente invención se pueden utilizar para detectar ácidos nucleicos diana que se originan de enfermedades infecciosas tales como del virus de hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia humana, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, virus de la gripe A, virus de la gripe B, y virus sincitial respiratorio.

Se volverán evidentes los aspectos adicionales, realizaciones y ventajas proporcionadas por la divulgación a la vista de la siguiente descripción.

25 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático que ilustra un ejemplo no limitante de una secuencia cubierta de conversión de ADN (CSC ADN) para la detección de un ácido nucleico en una muestra. El CSC ADN comprenden, en la dirección 5' a 3', una secuencia arbitraria (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) que se puede utilizar en una reacción de mellado, una secuencia (C) complementaria de la secuencia arbitraria, y una secuencia (D) complementaria del ácido nucleico diana. Las líneas verticales entre (A) y (C) indican la cantidad de hibridación entre las dos regiones.

La Figura 2 es un diagrama que ilustra esquemáticamente la progresión de una reacción ejemplar para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra, con las secuencias (A)-(D) que se describen en la FIG. 1, la secuencia (T) representa una secuencia diana, la secuencia (E) representa una secuencia de extensión, la secuencia (E') representa una secuencia de extensión mellada, y la secuencia (F) representa una secuencia de señal.

La Figura 3 representa los resultados de las reacciones utilizando el CSC ADN nº 1 (SEQ ID NO: 1) para detectar las diferentes concentraciones (10 nM, 1 nM, 0,1 nM, y 0,0 nM) del microARN humano hsa-miR-24, el ADN diana (SEQ ID NO: 6).

La Figura 4 representa los resultados de las reacciones utilizando la secuencia no cubierta de conversión de ADN (USC ADN) nº 1 (SEQ ID NO: 7) para detectar las diferentes concentraciones (10 nM, 1 nM, 0,1 nM, y 0,0 nM) del microARN humano hsa-miR-24, el ADN diana (SEQ ID NO: 6).

La Figura 5 representa los resultados de las reacciones utilizando el CSC ADN nº 2 (SEQ ID NO: 9) para detectar las diferentes concentraciones (10 nM, 1 nM, 0,1 nM, y 0,0 nM) del microARN humano hsa-miR-24, el ADN diana (SEQ ID NO: 6).

La Figura 6 representa los resultados de las reacciones utilizando el CSC ADN nº 3 (SEQ ID NO: 11) para detectar las diferentes concentraciones (10 nM, 1 nM, 0,1 nM, y 0,0 nM) del microARN humano hsa-miR-24, el ADN diana (SEQ ID NO: 6).

La Figura 7 representa los resultados de las reacciones utilizando el CSC ADN nº 4 (SEQ ID NO: 13) para detectar las diferentes concentraciones (10 nM, 1 nM, 0,1 nM, y 0,0 nM) del microARN humano hsa-miR-24, el ADN diana (SEQ ID NO: 6).

La Figura 8 representa los resultados de las reacciones utilizando el CSC ADN nº 5 (SEQ ID NO: 17) para detectar las diferentes concentraciones (10 nM, 1 nM, 0,1 nM, y 0,0 nM) del microARN humano hsa-miR-24, el ADN diana (SEQ ID NO: 6).

La Figura 9 representa los resultados de las reacciones utilizando el CSC ADN nº 6 (SEQ ID NO: 19) para detectar las diferentes concentraciones (10 nM, 1 nM, 0,1 nM, y 0,0 nM) del microARN humano hsa-miR-24, el ADN diana (SEQ ID NO: 6).

Descripción detallada

5 En sentido general, la divulgación se refiere a construcciones de ácido nucleico que son sorprendentemente eficaces en la detección de ácidos nucleicos diana en una muestra de ensayo. Las construcciones desveladas en el presente documento comprenden una secuencia de ácido nucleico que permite que las construcciones adopten estructuras que eviten la interacción o eventos de unión entre las construcciones y los ADN de señal que se generan en presencia de un ácido nucleico diana. Los métodos y construcciones de ácido nucleico desvelados en el presente documento proporcionan la detección selectiva y sensible de ácidos nucleicos diana ventajosamente en condiciones de baja temperatura e isotérmicas.

15 En un aspecto, la presente invención se refiere a construcciones de oligonucleótido cubiertos (a las que se hace referencia en el presente documento como una secuencia cubierta de conversión de ADN o CSC ADN) que son útiles en la detección de un ácido nucleico diana en una muestra. Como se representa en la realización ilustrativa de la Figura 1, un CSC ADN puede comprender una estructura horquillada (o estructura tallo-lazo) que tiene, en la dirección 5' a 3', una secuencia arbitraria (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B), una secuencia (C) complementaria de la secuencia arbitraria (A), y una secuencia (D) complementaria del extremo 3' del ácido nucleico diana.

20 La CSC ADN desvelada en el presente documento comprende una secuencia arbitraria (A). La secuencia arbitraria (A) de la CSC ADN comprende cualquier secuencia de ácido nucleico deseada y no se limita a cualquier secuencia particular. Como se expone con mayor detalle posteriormente, la secuencia arbitraria (A) proporciona al menos una parte de la matriz para un ADN de señal (por ejemplo, (F) de la FIG. 2), cuya producción indica la presencia del ácido nucleico diana. También, como se expone en el presente documento, la secuencia (A) proporciona al menos una parte de una secuencia que se puede hibridar con una secuencia complementaria comprendida en la secuencia (C). La secuencia arbitraria (A) de la CSC ADN no está limitada por su longitud. En algunas realizaciones, la secuencia arbitraria (A) en la CSC ADN tiene desde aproximadamente 5 a aproximadamente 100 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 5 y 100. En realizaciones, la secuencia arbitraria (A) en la CSC ADN tiene desde aproximadamente 5 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 5 y 30. En algunas realizaciones, la secuencia arbitraria (A) en la CSC ADN tiene desde aproximadamente 10 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 10 y 30. En algunas realizaciones, la secuencia arbitraria (A) en la CSC ADN tiene desde aproximadamente 15 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 15 y 30.

35 La CSC ADN comprende un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B). En su forma de cadena sencilla (por ejemplo, la estructura horquillada de la Figura 1) el sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) puede comprender una secuencia que sea complementaria de una secuencia que se puede mellar por una endonucleasa. La secuencia que está mellada por la endonucleasa puede estar dentro de, corriente abajo, o corriente arriba de la secuencia que es reconocida específicamente por la endonucleasa. Adecuadamente, cuando es de cadena doble, el sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) puede ser reconocido por una endonucleasa presente en la reacción, y el sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) (o una secuencia adyacente al sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B)) puede escindir sobre solo una cadena del ADN de cadena doble (es decir, mellada). Como se describe con mayor detalle posteriormente, la unión de un ácido nucleico diana a la CSC ADN ceba la replicación mediante la ADN polimerasa para crear una forma de doble cadena activa del sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) que puede servir como sitio de reconocimiento para una endonucleasa. El mellado por endonucleasa en el sitio de la endonucleasa (B) de doble cadena recién creado, o en un sitio adyacente del sitio de la endonucleasa (B) de doble cadena recién creado, ceba entonces la replicación mediante la ADN polimerasa y genera un ADN de señal (véase, por ejemplo, la Figura 2). Como se ilustra en la Figura 2, el sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) se oriente de manera que la cadena recién replicada se mella, no la CSC ADN. Es decir, cuando se genera la cadena recién replicada la orientación del sitio de reconocimiento de la endonucleasa dirige la actividad endonucleasa (escisión) de la cadena recién replicada. Por lo tanto, el sitio de reconocimiento de la endonucleasa comprende una secuencia que es complementaria de una secuencia que está mellada por una endonucleasa, permitiendo que el oligonucleótido CSC se mantenga intacto a lo largo de la reacción (es decir, la CSC ADN no está mellado ni escindido).

55 La CSC ADN comprende una secuencia (C) complementaria de la secuencia arbitraria (A). Como se desvela en el presente documento, al menos una parte de la secuencia (C) se hibrida con al menos una parte de la región complementaria de la secuencia arbitraria (A) y forma una estructura horquillada (o de tallo lazo). Véase, por ejemplo, la FIG. 1. Como se ilustra en la realización no limitante de la Figura 1, el tallo de cadena doble está flanqueado en un lado por una región de bucle no emparejado que comprende el sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B), y en el otro extremo por la secuencia (D) complementaria de un ácido nucleico diana.

65 La secuencia arbitraria (C) no está limitada en longitud y puede ser desde aproximadamente 5 a aproximadamente 100 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 5 y 100. En algunas realizaciones, la secuencia (C) tiene desde aproximadamente 5 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 5 y 30. En algunas realizaciones, la secuencia (C) en la CSC ADN tiene desde aproximadamente 10 a

aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 10 y 30. En algunas realizaciones, la secuencia (C) tiene desde aproximadamente 15 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 15 y 30. Tampoco es necesario que la secuencia (C) tenga la misma longitud que la secuencia arbitraria (A). En algunas realizaciones, la secuencia (C) puede tener la misma longitud que la secuencia arbitraria (A), o puede ser aproximadamente de 1-20 o aproximadamente de 1-10 bases más corta que la secuencia arbitraria (A). La estructura del tallo de la CSC ADN puede comprender en general una longitud del ADN de doble cadena que varía desde aproximadamente 3 a aproximadamente 60 pares de bases de ácido nucleico de longitud. En algunas realizaciones, el tallo comprende una longitud de ADN de doble cadena que varía desde aproximadamente 5 a aproximadamente 20 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 5 y 20.

El tallo también puede incluir protuberancias o faltas de coincidencia, y la secuencia (C) no tiene que ser un 100 % complementaria de la secuencia (A). En algunas realizaciones, la secuencia (C) puede tener un 100 % de complementariedad con todas, o partes de, la secuencia arbitraria (A). Por ejemplo, la secuencia (C) puede tener más de aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o un 90 % de complementariedad con la secuencia (A). A pesar de las faltas de coincidencia, las dos secuencias tienen en general la capacidad de hibridarse selectivamente entre ellas en condiciones apropiadas. En algunas realizaciones, la cantidad de complementariedad entre la secuencia (A) y la secuencia (C) es desde aproximadamente un 80 % a un 100 % que puede permitir la hibridación en condiciones rigurosas o altamente rigurosas, tales como, por ejemplo, las condiciones desveladas en el presente documento.

En algunas realizaciones, el tallo de doble cadena de la estructura tallo-lazo, por ejemplo, las partes de las secuencias (A) y (C), de una CSC ADN puede tener un contenido en GC que varía desde aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 70 %, incluyendo un porcentaje de entre el 20 % y el 70 %.

En algunas realizaciones, al menos una parte del sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) se localiza en el bucle de cadena sencilla de la estructura de tallo lazo (por ejemplo, la FIG. 1). En algunas realizaciones, todo sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) se localiza en la secuencia que comprende la región del lazo. En general, el lazo en la estructura tallo lazo puede tener desde aproximadamente 3 a aproximadamente 30 bases de nucleótido y cualquier número entre estos. En algunas realizaciones, el sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) tiene desde aproximadamente 4 a aproximadamente 10 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 4 y 10.

La secuencia (D) de la CSC ADN (véase, por ejemplo, la Figura 1) es complementaria de al menos una parte de la secuencia del extremo 3' del ácido nucleico diana, y puede tener una longitud que varía desde aproximadamente 5 a aproximadamente 100 bases de ácido nucleico incluyendo cualquier número entero entre 5 y 100. En algunas realizaciones, la secuencia (C) tiene desde aproximadamente 5 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 5 y 30. En algunas realizaciones, la secuencia (D) en la CSC ADN tiene desde aproximadamente 10 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 10 y 30. En algunas realizaciones más, la secuencia (D) en la CSC ADN tiene desde aproximadamente 15 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 15 y 30.

La secuencia (D) puede tener una complementariedad del 100 % con la secuencia del extremo 3' del ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, la secuencia (D) puede tener una complementariedad menor del 100 % con la secuencia del extremo 3' del ácido nucleico diana y puede variar, por ejemplo, una complementariedad de desde aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 99 % con la secuencia del extremo 3' del ácido nucleico diana. En otras realizaciones más, la secuencia (D) puede tener desde aproximadamente un 80 % a un 100 % (incluyendo porcentajes entre el 80 % y el 100 %) de complementariedad con la secuencia del extremo 3' del ácido nucleico diana.

Las secuencias complementarias son capaces de formar interacciones de enlaces de hidrógeno para formar una estructura de ácido nucleico de cadena doble (por ejemplo, pares de bases de ácido nucleico). Por ejemplo, una secuencia que sea complementaria de una primera secuencia incluye una secuencia que sea capaz de formar pares de bases de Watson-Crick con la primera secuencia. Como se utiliza en el presente documento, en el término "complementariedad" no se necesita que la secuencia sea complementaria en toda la longitud de su cadena complementaria y engloba una secuencia que es complementaria de una parte de otra secuencia. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una secuencia complementaria engloba secuencias que son complementarias en toda la longitud de la secuencia o sobre una parte de la misma. Por ejemplo, dos secuencias pueden ser complementarias entre ellas sobre una longitud que varía desde aproximadamente 2 a aproximadamente 100 nucleótidos consecutivos (contiguos), o cualquier entero entre 2 y 100. En algunas realizaciones, dos secuencias pueden ser complementarias entre ellas sobre una longitud que varía desde aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos consecutivos (contiguos), o cualquier entero entre 15 y 30. Como se utiliza en el presente documento, secuencias complementarias puede englobar secuencias que tengan algunas faltas de coincidencia entre las secuencias. Por ejemplo, las secuencias complementarias pueden incluir secuencias que son complementarias en al menos aproximadamente un 70 % a un 100 %, preferentemente en más del 95 % de la longitud de la secuencia. Además de cierta cantidad de faltas de coincidencia, las secuencias complementarias en general tienen la capacidad de hibridarse selectivamente entre ellas en condiciones apropiadas tales como, por ejemplo, condiciones

rigurosas y altamente rigurosas tales como las que se describen en el presente documento.

La CSC ADN puede sintetizarse por métodos conocidos. Por ejemplo, la CSC ADN se puede sintetizar utilizando un método de fosforamidita, un método de fosfotriéster, un método de H-fosfonato, o un método de tiofosfonato.

5 La CSC ADN puede comprender modificaciones químicas tales como las que se conocen en general en la técnica. En algunas realizaciones, por ejemplo, la CSC ADN puede comprender ácidos nucleicos modificados químicamente (por ejemplo, derivados 2'-O-metil, fosforotioatos, etc.), modificaciones en el extremo 3', modificaciones en el extremo 5', o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el extremo 3' de la CSC ADN puede modificarse de manera que no se produzca una reacción de extensión a partir del extremo 3' de la CSC ADN (por ejemplo, al unirse a una secuencia diana u otra secuencia no diana, que tenga una protuberancia más allá de la secuencia (D) que pueda servir como matriz para la extensión por polimerasas). Como se ilustra en la Figura 2, es el extremo 3' del ácido nucleico diana, no la CSC ADN el que inicia la replicación de ADN que produce el ADN de señal. Cualquier replicación que se inicie a partir del extremo 3' de la CSC ADN puede dar lugar a errores de detección (por ejemplo, falsos positivos). Además, también pueden dar lugar a errores de detección las reacciones de extensión específicas a partir de un extremo 3' no modificado de la CSC ADN que surja de eventos tales como, por ejemplo, la unión entre la CSC ADN y una secuencia no diana, la unión entre la CSC ADN y una secuencia diana en una posición incorrecta, o la síntesis de ADN no matrizada de novo o al inicio. En consecuencia, en algunas realizaciones, la CSC ADN comprende una modificación en el extremo 3' que pueda reducir la existencia o evite completamente la existencia de cualquier reacción de extensión no deseada, tal como las que se han expuesto anteriormente. Ejemplos no limitantes de modificaciones del extremo 3' incluyen TAMRA, DABCYL, y FAM. Otros ejemplos no limitantes de modificaciones incluyen, pero ejemplo, la biotilación, fluorocromación, fosforilación, tiolación, o aminación.

25 En otro aspecto, la presente invención engloba métodos para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra. Los métodos comprenden en general poner en contacto la muestra con: una CSC ADN como se ha desvelado en el presente documento que comprende una secuencia (D) complementaria al extremo 3' del ácido nucleico diana; una polimerasa; y una endonucleasa.

30 El método comprende poner en contacto una muestra con una endonucleasa. La endonucleasa puede ser una endonucleasa de mellado o una endonucleasa de restricción que sea capaz de o que se puede utilizar en el mellado de la secuencia complementaria del sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) dentro de la CSC ADN. En algunas realizaciones, la endonucleasa comprende una endonucleasa de mellado o una endonucleasa de restricción que puede catalizar o se puede utilizar para catalizar una reacción de mellado de un ADN de cadena doble. En realizaciones que proporcionan una endonucleasa de mellado, el enlace fosfodiéster de una cadena de un ADN de doble cadena se puede escindir para generar un grupo fosfato sobre el lado 5' del sitio de escisión y un grupo hidroxilo en el lado 3'. Ejemplos no limitantes de endonucleasas de mellado incluyen Nb. BbvCI, Nt.AlwI, Nt.BbvCI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, Nt.BspQI, Nt.BstNBI, Nb.BsmI, Nt.CviPII, y Nt.BsmAI.

40 En algunas realizaciones, la endonucleasa puede ser una endonucleasa de restricción. En estas realizaciones, el sitio de la endonucleasa de restricción puede modificarse de manera que la endonucleasa de restricción escinda el enlace fosfodiéster solo en una cadena de un ADN de cadena doble y genere una mella en la doble cadena. Se pueden utilizar métodos o estrategias para modificar la actividad de la endonucleasa de restricción, incluyendo, por ejemplo, tales como una modificación química al menos en una cadena de un ácido nucleico de cadena doble para que no se escinda por la enzima de restricción. Un ejemplo no limitante de dicha modificación incluye la sustitución del átomo de oxígeno del enlace fosfodiéster de una cadena por un átomo de azufre.

50 En realizaciones que proporcionan una endonucleasa de restricción, el enlace fosfodiéster de una cadena de un ADN de doble cadena se puede escindir para generar un grupo fosfato sobre el lado 5' del sitio de escisión y un grupo hidroxilo en el lado 3'. Ejemplos no limitantes de endonucleasas de restricción incluyen Hinc II, Hind II, Ava I, Fnu4HI, Tth111I y NciI.

El método comprende poner en contacto una muestra con una polimerasa. En algunas realizaciones, la polimerasa puede ser una ADN polimerasa que tenga una actividad de desplazamiento de cadenas. En algunas realizaciones, la polimerasa puede ser una polimerasa que carezca de actividad exonucleasa 5'-3', carezca de actividad exonucleasa 3'-5', o que carezca de ambas actividades de exonucleasa 5'-3' y 3'-5'. La polimerasa puede ser de origen eucariota, procariota o vírica y también puede estar modificada genéticamente. En algunas realizaciones, la polimerasa se selecciona de entre las que funcionan a temperaturas más bajas, incluyendo la temperatura ambiente (por ejemplo, de la sala). Ejemplos no limitantes de ADN polimerasas incluyen los fragmentos Klenow, ADN polimerasa I derivada de *E. coli*, ADN polimerasas Bst deficientes en exonucleasas 5' a 3' derivadas de *Bacillus stearothermophilus*, y ADN polimerasas Bca deficientes en exonucleasa 5' a 3' derivada de *Bacillus caldotenax*.

65 Una de las realizaciones no limitantes de los métodos desvelados en el presente documento se ilustra en la Figura 2. En resumen, se pone en contacto una muestra con una CSC ADN en presencia de una ADN polimerasa y una endonucleasa capaz de mellar la forma de cadena doble (es decir, la secuencia complementaria) del sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B), o un sitio adyacente a la forma de cadena doble del sitio de reconocimiento

de la endonucleasa (B). Si el ácido nucleico diana (T) está presente en la muestra, la secuencia del extremo 3' del ácido nucleico diana (T) se hibrida con la secuencia (D) que es complementaria a la diana y ceba o inicia la replicación por desplazamiento de la cadena (mediante la ADN polimerasa presente en la mezcla de reacción) generando de esta manera una secuencia de extensión (E) de doble cadena que incluye el sitio de reconocimiento (B) de cadena doble de la endonucleasa. El reconocimiento del sitio de reconocimiento (B) de cadena doble de la endonucleasa recién generado (por la endonucleasa presente en la mezcla de reacción), y que mella posteriormente la cadena recién generada (por la endonucleasa presente en la mezcla de reacción), genera una secuencia oligonucleotídica de señal (F) y una secuencia de extensión (E'). Debido a que el OH en 3' de la secuencia (E') de la melladura sirve como un sitio de inicio para posteriores rondas de replicación por desplazamiento de cadena, e oligonucleótido (F) se desplaza desde la CSC ADN por la ADN polimerasa que continúa la replicación y amplificación (F) en la mezcla de reacción.

Los métodos de acuerdo con la invención se pueden llevar a cabo en condiciones de temperatura isotérmica o sustancialmente constante. En realizaciones que se refieren a la ejecución del método a una temperatura sustancialmente constante, se permite cierta fluctuación de la temperatura. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una temperatura sustancialmente constante puede fluctuar dentro de un intervalo de temperaturas diana deseado o identificado (por ejemplo, aproximadamente +/- 2 °C o aproximadamente +/- 5 °C). En realizaciones, una temperatura sustancialmente constante puede incluir temperaturas que no incluyan un ciclado térmico. En algunas realizaciones, los métodos se pueden llevar a cabo a temperaturas isotérmicas o sustancialmente constantes, tales como, por ejemplo (1) temperaturas por debajo de la temperatura de fusión de la estructura tallo-lazo de la CSC ADN calculadas/previstas o determinadas experimentalmente; (2) temperaturas de o por debajo de aproximadamente la temperatura óptima de hibridación o anillamiento del ácido nucleico diana (T) con la secuencia (D) de la CSC ADN calculadas/previstas o determinadas experimentalmente; (3) temperaturas de o por debajo de la temperatura de fusión del ácido nucleico (T) unido a la CSC ADN calculadas/previstas o determinadas experimentalmente (normalmente, la temperatura de hibridación o anillamiento son ligeramente menores que la temperatura de fusión); o (4) temperaturas de o aproximadamente la temperatura de reacción óptima calculadas/previstas o determinadas experimentalmente para la polimerasa y/o endonucleasa presentes en la mezcla de reacción.

Los métodos pueden comprender temperaturas de reacción que varían desde aproximadamente 20 °C a aproximadamente 70 °C, incluyendo temperaturas más bajas que se encuentren en el intervalo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 42 °C. En algunas realizaciones, la temperatura de reacción es desde 35 °C a 40 °C (por ejemplo, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, o 40 °C). En otras realizaciones, la temperatura de reacción está por debajo de 65 °C, incluyendo temperaturas más bajas por debajo de aproximadamente 55 °C, 50 °C, 45 °C, 40 °C, o aproximadamente 30 °C. En otras realizaciones más, las temperaturas de reacción pueden ser de aproximadamente 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 46 °C, 47 °C, 48 °C, 49 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C, 61 °C, 62 °C, 63 °C, 64 °C, 65 °C, 66 °C, 67 °C, 68 °C, 69 °C, o aproximadamente 70 °C.

Los métodos se pueden llevar a cabo durante un tiempo que sea adecuado para permitir la amplificación de una cantidad detectable de la secuencia de señal en presencia de un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, el tiempo de reacción puede variar desde aproximadamente 10 minutos a 16 horas. En otras realizaciones más, el tiempo de reacción puede variar desde aproximadamente 10 a 120 minutos, o desde aproximadamente 15 a 60 minutos.

A lo largo de la memoria descriptiva, también se hace referencia al oligonucleótido (F) como ADN de señal. Debido a que el ADN de señal (F) se genera solo en presencia del ácido nucleico diana (T), los métodos de acuerdo con la presente invención detectan la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana (T) en una muestra detectando la presencia o ausencia del ADN de señal (F). El ADN de señal no se limita por la secuencia y puede ser cualquier secuencia que se pueda utilizar para la detección. El ADN de señal tampoco se limita por la longitud. En algunas realizaciones, el ADN de señal puede tener desde aproximadamente 10 a aproximadamente 100 bases de longitud, y todos los números enteros entre 5 y 100. En algunas realizaciones, el ADN de señal puede tener desde aproximadamente 5 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 5 y 30. En algunas realizaciones, el ADN de señal puede tener desde aproximadamente 10 a aproximadamente 30 bases de longitud, y todos los números enteros entre 10 y 30. En algunas realizaciones, el ADN de señal puede tener desde aproximadamente 10 a aproximadamente 30 bases de longitud, y todos los números enteros entre 15 y 30.

Los métodos de acuerdo con la divulgación se pueden llevar a cabo en condiciones de un tampón que comprenda un intervalo de pH desde aproximadamente 4 a aproximadamente 10 o desde aproximadamente 7 a aproximadamente 9. El tampón puede comprender una concentración de sales de desde aproximadamente 10 mM a aproximadamente 500 mM, o desde aproximadamente 50 mM a 150 mM. En algunas realizaciones, el método se puede llevar a cabo utilizando una cantidad de CSC ADN que permita la amplificación de una cantidad detectable de la secuencia de señal en presencia de un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, la concentración de CSC ADN puede variar desde aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 µM, desde aproximadamente 1 nM a aproximadamente 150 nM, desde aproximadamente 5 nM a aproximadamente 50 nM, o desde aproximadamente 5

nM a 25 nM.

La presencia del ADN de señal se puede detectar por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. También se puede detectar el ADN de señal utilizando polarización de fluorescencia, inmunoensayos, fluorescencia por transferencia de energía de resonancia, marcado enzimático (tal como peroxidasa o fosfatasa alcalina), marcado fluorescente (tal como con fluoresceína o rodamina), quimioluminiscencia, bioluminiscencia, resonancia de plasmones superficiales (SPR), o una sonda de ADN modificada con un fluoróforo (por ejemplo, una sonda TaqMan). El producto de amplificación también se puede detectar utilizando un nucleótido marcado con una biotina, por ejemplo. En dicho caso, la biotina en el producto de amplificación puede detectarse utilizando avidina marcada con fluorescencia o avidina marcada con una enzima, por ejemplo. El producto de amplificación también se puede detectar con electrodos utilizando un intercalador redox conocido por los expertos en la técnica. El producto de amplificación también se puede detectar utilizando una resonancia de plasmones superficiales (SPR) o utilizando un Quartz Crystal Microbalance (QCM).

Los métodos de acuerdo con la presente invención detectan la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana (T) en una muestra. El ácido nucleico diana (por ejemplo, (T) en la FIG. 2) puede comprender cualquier secuencia de ácido nucleico y puede incluir ADN, ARN, ácidos nucleicos modificados químicamente, ácidos nucleicos no naturales, análogos de ácido nucleico, o cualquier híbrido o combinación de los mismos. En consecuencia, en algunas realizaciones, el ADN puede incluir un ADNc, un ADN genómico, y un ADN sintético, y el ARN puede incluir, el ARN total, ARNm, ARNip, ARNhn, piARN, aARN, miARN, y ARN sintético. Aunque algunas realizaciones se refieren a secuencias de ácido nucleico diana particulares, cualquier secuencia de ácido nucleico puede ser una secuencia de ácido nucleico diana para detectarse. La divulgación proporciona la detección de un ácido nucleico diana con selectividad y sensibilidad incluso cuando el ácido nucleico es un ácido nucleico de cadena corta. En consecuencia, el grado de complementariedad entre las secuencias (D) y (T) permite la hibridación específica entre la secuencia (por ejemplo, el número de ácidos nucleicos complementarios en las secuencias (D) y (T) evita la hibridación no específica en un conjunto determinado de condiciones de reacción).

En realizaciones, la secuencia de ácido nucleico diana puede ser de, o derivarse de cualquiera de varias fuentes que incluyen, por ejemplo, el ADN genómico, el ARNm expresado, secuencias de ácido nucleico de agentes patógenos (microbios, virus), o ácidos nucleicos terapéuticos. En consecuencia, la CSC ADN y los métodos desvelados en el presente documento se pueden utilizar para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades (por ejemplo, que surgen de fuentes genéticas e infecciosas), la identificación de contaminantes (por ejemplo, enfermedades que provienen de los alimentos, contaminación del equipamiento), medicina personalizada (por ejemplo, control y/o pronóstico de una terapia), y similares. Por ejemplo, se puede llevar a cabo el ensayo de diagnóstico molecular con respecto a las siguientes enfermedades infecciosas: Virus de Hepatitis B (VHB), hepatitis C (VHC); VHC (genotipos 1 - 6); virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1); *Chlamydia trachomatis*; *Neisseria gonorrhoeae*; gripe A; gripe B, Virus sincitial respiratorio (RSV).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana puede comprender microARN (miARN). Los microARN incluyen moléculas pequeñas de ARN no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos. Los microARN funcionan en la regulación de la transcripción y postranscripcional de la expresión genética. Los microARN funcionan por emparejamiento de bases con regiones complementarias del ARN mensajero (ARNm), dando como resultado el silenciamiento genético mediante la represión traduccional o la degradación de la diana.

Existen varias enfermedades humanas asociadas con la disfunción del ARNm, y se pueden utilizar los métodos, composiciones y kits de acuerdo con la presente invención con fines diagnósticos. Por ejemplo, se han asociado los miARN con cánceres, por ejemplo, una enfermedad que se conoce por asociarse con una disfunción del miARN es la leucemia linfocítica crónica. Hay otros varios ARNm conocidos como los oncomir que se han relacionado con cánceres. Algunos ejemplos incluyen el miR-17 (SEQ ID NO: 21); hsa-miR-19 (SEQ ID NO: 22); hsa-miR-21 (SEQ ID NO: 23); hsa-miR-155 (SEQ ID NO: 24); y hsa-miR-569 (SEQ ID NO: 25). Otros miARN más se han asociado con infecciones víricas y la respuesta eucariota a patógenos bacterianos. Hay estudios que han caracterizado los cambios en la expresión de microARN del huésped a continuación de la infección con bacterias Gramnegativas exclusivamente extracelulares (*Helicobacter pylori*) o intracelular (*Salmonella enterica*), así como la respuesta a Grampositivas (*Listeria monocytogenes*) y otros agentes patógenos (*Mycobacterium* y especies de *Francisella*). (RNA Biol. Jun; 9 (6):742-50.) Otros miARN de interés incluyen sin limitación: hsa-miR-24 (SEQ ID NO: 26); hsa-miR-107 (SEQ ID NO: 27); y hsa-miR-221 (SEQ ID NO: 28).

Se puede utilizar cualquier tipo de muestra que pueda comprender un ácido nucleico diana en los métodos desvelados en el presente documento. Como tal, la muestra que contiene o es sospechosa de contener un ácido nucleico diana no se limita específicamente, e incluye, por ejemplo, muestras biológicas derivadas de sujetos vivos, tal como sangre completa, suero, capa leucocitaria, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, licor seminal, saliva, tejidos (tales como tejidos cancerosos o ganglios linfáticos), cultivos celulares (tales como cultivos de células de mamífero o cultivos bacterianos); muestras que contengan ácidos nucleicos tales como viroides, virus, bacterias, hongos, levaduras, plantas y animales; muestras (tales como alimentos y preparaciones biológicas) que pueden contener o estar infectadas con microorganismos tales como virus o bacterias y muestras que pueden contener sustancias biológicas tales como suelo, procesamientos industriales y equipos de fabricación, y aguas residuales. Además, una

muestra puede procesarse por cualquier método conocido para preparar una composición que contenga un ácido nucleico utilizado en los métodos desvelados en el presente documento. Ejemplos de dichas preparaciones incluyen la rotura celular (por ejemplo, lisados celulares y extractos), fraccionamiento de muestras, ácidos nucleicos en las muestras, y grupos moleculares de ácido nucleico específicos tal como muestras enriquecidas en ARNm. La muestra que se utiliza en el método de detección de un ácido nucleico diana de la presente invención no se limita a los derivados de productos biológicos o naturales como se ha mencionado anteriormente y puede ser una muestra que contenga un oligonucleótido sintético.

Los métodos de acuerdo con la presente invención se pueden llevar a cabo en combinación con el sistema de preparación de muestras m2000sp de Abbott. El m2000sp utiliza una tecnología de partículas magnéticas para capturar los ácidos nucleicos y lava las partículas para retirar los componentes de la muestra no unidos. Los ácidos nucleicos unidos se eluyen y transfieren a una placa de 96 pocillos profundos. El m2000sp de Abbott también puede combinarse con los ácidos nucleicos lavados transferidos a la placa de 96 pocillos profundos cualquiera de los reactivos necesarios para llevar a cabo los métodos de acuerdo con la presente tecnología. Por ejemplo, se pueden añadir las CSC ADN, polimerasas, endonucleasas, balizas moleculares, y cualquier otro reactivo (por ejemplo, los dNTP) según se necesite o desee.

Los métodos de acuerdo con la presente invención también pueden interactuar con plataformas *in situ*. Por ejemplo, la incorporación de un desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) en una cadena de ADN en crecimiento implica la formación de un enlace covalente y la liberación de pirofosfato y un ion de hidrógeno cargado positivamente que afecta el pH de la reacción. Como tal, la síntesis de ADN de señal de acuerdo con los métodos de la presente invención se puede detectar siguiendo los cambios del pH utilizando, por ejemplo, micro-pHímetros *in situ*. Por ejemplo, se puede suministrar el sistema i-STAT *in situ* de Abbott con cartuchos desechables de un solo uso que contienen sensores microfabricados, soluciones de calibración, sistemas de fluidica, y cámaras de desechos para el análisis del pH.

Los métodos desvelados en el presente documento pueden comprender reactivos adicionales. Algunos ejemplos no limitantes de otros reactivos que se pueden utilizar en la reacción de amplificación de ácido nucleico incluyen sales metálicas tales como el cloruro sódico, cloruro magnésico, acetato magnésico, sulfato magnésico; sustratos tales como una mezcla de dNTP, y soluciones tampón tal como un tampón de Tris-HCl, tampón de tricina, tampón de fosfato sódico, y tampón de fosfato potásico. Además, se pueden utilizar agentes tales como el dimetilsulfóxido y betaína (N,N-trimetilglicina); sustancias ácidas descritas en la Publicación Internacional N.º WO 99/54455; y complejos catiónicos.

Los métodos y estructuras de ácido nucleico que se proporcionan en el presente documento pueden utilizarse en métodos que proporcionan una amplificación exponencial de un ADN de señal. Por ejemplo, la amplificación exponencial de un ADN de señal se conseguía utilizando una secuencia de conversión de ADN en combinación con un segundo ADN de señal de amplificación. Véase la Solicitud Internacional PCT/JP2011/078717 (Komiya), presentada el 12 de dic. De 2011, y presentada como la Solicitud de Patente de EE. UU. 13/992.058, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Los siguientes ejemplos tienen la intención de ser ilustrativos de los aspectos y realizaciones descritos anteriormente. Ni la divulgación anterior ni los ejemplos posteriores se deberían ver como limitantes del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

Se llevó a cabo una reacción para la detección de la presencia de un ADN de señal n presencia y ausencia de un ADN diana utilizando una secuencia cubierta de conversión de ADN n° 1 representada por la SEQ ID NO: 1 (CSC ADN n° 1). Se llevó a cabo una segunda reacción utilizando una secuencia no cubierta de conversión de ADN n° 1 representada por la SEQ ID NO: 7 (USC ADN n° 1).

El ácido nucleico diana era el microARN humano hsa-miR-24 (SEQ ID NO: 6). Ambas reacciones se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 25 ml que contenía el tampón 2 de New England Biolabs (NEB) que tiene una concentración final de 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, pH 7,9. La endonucleasa de mellado que se utiliza en la reacción era Nt.AlwI con una concentración de 0,1 unidades/ml. La polimerasa utilizada en la reacción era el fragmento grande de la ADN polimerasa Bst con una concentración de 0,08 unidades/ml. Los dNTP estaban presentes con una concentración final de 200 µM cada uno. La CSC ADN n° 1 y USC ADN n° 1 estaban presentes en la reacción a una concentración final de 100 nM. Se utilizaron sondas de baliza molecular para detectar la presencia del ADN de señal y estaban presentes con una concentración final de 100 nM.

La CSC ADN n° 1 tiene la siguiente secuencia:

5' TGATAGCCCTGTACAATGCTGCTCAGAGATCCATTGTACAGGGCTATCACTGT
TCCTGCTGAACTGAGCCA3'-idT (SEQ ID NO.: 1)

La CSC ADN nº 1 incluye: una secuencia arbitraria (A) (SEQ ID NO: 2); un sitio de reconocimiento (B) de endonucleasa Nt.AlwI (SEQ ID NO: 3) que se puede utilizar en la reacción de mellado; una secuencia (C) (SEQ ID NO: 4) complementaria de la secuencia arbitraria (A) (SEQ ID NO: 2); y una secuencia (D) (SEQ ID NO: 5) complementaria del ácido nucleico diana humano el microARN hsa-miR-24 (SEQ ID NO: 6).

La USC ADN nº 1 tiene la siguiente secuencia:

5' TGATAGCCCTGTACAATGCTGCTCAGAGATCCCTGTTCCCTGCTGAACTGAGCCA
3'-idT (SEQ ID NO.: 7)

La USC ADN nº 1 tiene en común con la CSC ADN nº 1 la misma secuencia arbitraria (A) (SEQ ID NO: 2), un sitio de reconocimiento (B) de endonucleasa Nt.AlwI (SEQ ID NO: 3); y una secuencia (D) (SEQ ID NO: 5) complementaria del ácido nucleico diana humano el microARN hsa-miR-24 (SEQ ID NO: 6). La USC ADN nº 1 no tienen una secuencia (C) complementaria de la secuencia arbitraria (A), y por lo tanto no forma una estructura ahorquillada de lazo como se ilustra en la Figura 1.

Tanto la CSC ADN nº 1 como la USC ADN nº 1 tienen una modificación de timidina invertida 3' (idT) para transmitir resistencia a la degradación de nucleolítica. Esta modificación también evitará el cebado no específico de la replicación del ADN.

El ácido nucleico diana se corresponde con el microARN humano hsa-miR-24 que tiene la siguiente secuencia:

5' TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG 3' (SEQ ID NO: 6)

Para detectar la presencia del ADN de señal en cada reacción, se utilizó la siguiente baliza molecular:

5' (FAM)-CGCGATGATAGCCCTGTACAATGCTGCTTCGCG-(DABCYL) 3' (SEQ ID NO: 8)

Los resultados de las reacciones utilizando la CSC ADN nº 1 para detectar el microARN humano hsa-miR-24 que se dirige al ADN diana (SEQ ID NO: 6) a diferentes concentraciones (10 nM, 1 nM, 0,1 nM, y 0,0 nM) se muestran en la Figura 3. Los resultados de las reacciones utilizando la USC ADN nº 1 para detectar el ADN diana presente a diferentes concentraciones (10 nM, 1 nM, 0,1 nM, y 0,0 nM) se muestran en la Figura 4. En las Figuras 3 y 4, el eje vertical muestra la intensidad de fluorescencia, y el eje horizontal muestra el tiempo en minutos. Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo a 37 °C a intervalos de 1 minuto durante 120 minutos utilizando un sistema CFX 96 de PCR de Bio-Rad.

Ejemplo 2

Se llevaron a cabo las reacciones para la detección de la presencia de un ADN de señal en presencia y ausencia de un ADN diana utilizando una secuencia cubierta de conversión de ADN nº 3 representada por la SEQ ID NO: 9 (CSC ADN nº 2). El ácido nucleico diana era el microARN humano hsa-miR-24 (SEQ ID NO: 6).

Las reacciones se llevaron a cabo con un volumen de reacción de 25 ml que contenía el tampón 2 de New England Biolabs (NEB) que tiene una concentración final de 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, pH 7,9. La endonucleasa de mellado que se utilizó en la reacción era Nt.AlwI presente a una concentración de 0,1 unidades/ml. La polimerasa utilizada en la reacción era el fragmento grande de la ADN polimerasa Bst con una concentración de 0,08 unidades/ml. Los dNTP estaban presentes con una concentración final de 200 µM cada uno. La CSC ADN nº 2 estaba presente en la reacción a una concentración final de 100 nM. Se utilizó una sonda de baliza molecular para detectar la generación del ADN de señal y estaba presente a una concentración final de 100 nM.

La CSC ADN nº 2 tiene la siguiente secuencia:

5' TGATAGCCCTGTACAATGCTGCTCAGAGATCCAGCATTGTACAGGGCTATCACT
GTTCCCTGCTGAACTGAGCCA3'-idT (SEQ ID NO.: 9)

La CSC ADN nº 2 incluye: una secuencia arbitraria (A) (SEQ ID NO: 2); un sitio de reconocimiento (B) de endonucleasa Nt.AlwI (SEQ ID NO: 3) que se puede utilizar en la reacción de mellado; una secuencia (C) (SEQ ID NO: 10) complementaria de la secuencia arbitraria (A) (SEQ ID NO: 2); y una secuencia (D) (SEQ ID NO: 5) complementaria del ácido nucleico diana humano el microARN hsa-miR-24 (SEQ ID NO: 6). La CSC ADN también

tiene una modificación de timidina invertida en el extremo 3'.

El ácido nucleico diana se corresponde con el microARN humano hsa-miR-24 que tiene la siguiente secuencia:
5' TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG 3' (SEQ ID NO: 6)

5 Para detectar la presencia del ADN de señal generado después de la unión del microARN humano hsa-miR-24, el ADN diana (SEQ ID NO: 6) a la CSC ADN nº 2, se utilizó la siguiente baliza molecular:
5' (FAM)-CGCGATGATAGCCCTGTACAATGCTGCTTCGCG-(DABCYL) 3' (SEQ ID NO: 8)

10 Los resultados de las reacciones utilizando la CSC ADN nº 2 para detectar el microARN humano hsa-miR-24, el ADN diana (SEQ ID NO: 6) a diferentes concentraciones (10 nM, 1 nM, 0,1 nM, y 0,0 nM) se muestran en la Figura 5. En la Figura 5, el eje vertical muestra la intensidad de fluorescencia, y el eje horizontal muestra el tiempo en minutos. Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo a 37 °C a intervalos de 1 minuto durante 120 minutos utilizando un sistema CFX 96 de PCR de Bio-Rad.

15 Ejemplo 3

Se llevaron a cabo las reacciones para la detección de la presencia de un ADN de señal en presencia y ausencia de un ADN diana utilizando una secuencia cubierta de conversión de ADN nº 3 representada por la SEQ ID NO: 11 (CSC ADN nº 3). El ácido nucleico diana era el microARN humano hsa-miR-24 (SEQ ID NO: 6).

25 Las reacciones se llevaron a cabo con un volumen de reacción de 25 ml que contenía el tampón 2 de New England Biolabs (NEB) que tiene una concentración final de 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, pH 7,9. La endonucleasa de mellado que se utilizó en la reacción era Nt.AlwI presente a una concentración de 0,1 unidades/ml. La polimerasa utilizada en la reacción era el fragmento grande de la ADN polimerasa Bst con una concentración de 0,08 unidades/ml. Los dNTP estaban presentes con una concentración final de 200 µM cada uno. La CSC ADN nº 3 estaba presente en la reacción a una concentración final de 100 nM. Se utilizó una sonda de baliza molecular para detectar la generación del ADN de señal y estaba presente a una concentración final de 100 nM.

30 La CSC ADN nº 3 tiene la siguiente secuencia:

5'TGATAGCCCTGTACAATGCTGCTCAGAGATCCCAGGGCTATCACTGTTCCCTGCT
GAACTGAGCCA3'-idT (SEQ ID NO.: 11)

35 La CSC ADN nº 3 incluye: una secuencia arbitraria (A) (SEQ ID NO: 2); un sitio de reconocimiento (B) de endonucleasa Nt.AlwI (SEQ ID NO: 3) que se puede utilizar en la reacción de mellado; una secuencia (C) (SEQ ID NO: 12) complementaria de la secuencia arbitraria (A) (SEQ ID NO: 2); y una secuencia (D) (SEQ ID NO: 5) complementaria del ácido nucleico diana humano el microARN hsa-miR-24 (SEQ ID NO: 6). La CSC ADN nº 3 también tiene una modificación de timidina invertida en el extremo 3'.

40 Para detectar la presencia del ADN de señal generado después de la unión del microARN humano hsa-miR-24, el ADN diana (SEQ ID NO: 6) a la CSC ADN nº 3, se utilizó la siguiente baliza molecular:
5' (FAM)-CGCGATGATAGCCCTGTACAATGCTGCTTCGCG-(DABCYL) 3' (SEQ ID NO: 8)

45 Los resultados de las reacciones utilizando la USC ADN nº 3 para detectar el ADN diana presente a diferentes concentraciones (10 nM, 1 nM, 0,1 nM, y 0,0 nM) se muestran en la Figura 6. En la Figura 6, el eje vertical muestra la intensidad de fluorescencia, y el eje horizontal muestra el tiempo en minutos. Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo a 37 °C a intervalos de 1 minuto durante 120 minutos utilizando un sistema CFX 96 de PCR de Bio-Rad.

50 Ejemplo 4

Se llevaron a cabo las reacciones para la detección de la presencia de un ADN de señal en presencia y ausencia de un ADN diana utilizando una secuencia cubierta de conversión de ADN nº 4 representada por la SEQ ID NO: 13 (CSC ADN nº 4). El ácido nucleico diana era el microARN humano hsa-miR-24 (SEQ ID NO: 6).

60 Las reacciones se llevaron a cabo con un volumen de reacción de 25 ml que contenía el tampón 2 de New England Biolabs (NEB) que tiene una concentración final de 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, pH 7,9. La endonucleasa de mellado que se utilizó en la reacción era Nb. BbvCI, que estaba presente a una concentración de 0,1 unidades/ml. La polimerasa utilizada en la reacción era el fragmento grande de la ADN polimerasa Bst que estaba presente a una concentración de 0,08 unidades/ml. Los dNTP estaban presentes con una concentración final de 200 µM cada uno. La CSC ADN nº 4 estaba presente en la reacción a una concentración final de 100 nM. Se utilizó una sonda de baliza molecular presente a una concentración final de 100 nM para detectar la generación del ADN de señal.

La CSC ADN nº 4 tiene la siguiente secuencia:

5'TGATAGCCCTGTACAATGCCTCAGCCATTGTACAGGGCTATCACTGTTCCCTGCT
GAACTGAGCCA3'-idT (SEQ ID NO.: 13)

5 La CSC ADN nº 4 incluye: una secuencia arbitraria (A) (SEQ ID NO: 14); un sitio de reconocimiento (B) de endonucleasa Nb.BbvCI (SEQ ID NO: 15) que se puede utilizar en la reacción de mellado; una secuencia (C) (SEQ ID NO: 16) complementaria de la secuencia arbitraria (A) (SEQ ID NO: 14); y una secuencia (D) (SEQ ID NO: 5) complementaria del ácido nucleico diana humano el microARN hsa-miR-24 (SEQ ID NO: 6). La CSC ADN nº 4 también tiene una modificación de timidina invertida en el extremo 3'.

Para detectar la presencia del ADN de señal generado después de la unión del microARN humano hsa-miR-24, el ADN diana (SEQ ID NO: 6) a la CSC ADN nº 4, se utilizó la siguiente baliza molecular:
5' (FAM)-CGATGATAGCCCTGTACAATGCCTCATCG-(DABCYL) 3' (SEQ ID NO: 31)

15 Los resultados de las reacciones utilizando la CSC ADN nº 4 para detectar el microARN humano hsa-miR-24 (SEQ ID NO: 6), el ADN diana, a diferentes concentraciones (10 nM, 1 nM, 0,1 nM, y 0,0 nM) se muestran en la Figura 7. En la Figura 7, el eje vertical muestra la intensidad de fluorescencia, y el eje horizontal muestra el tiempo en minutos. Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo a 37 °C a intervalos de 1 minuto durante 120 minutos utilizando un sistema CFX 96 de PCR de Bio-Rad.

Ejemplo 5

25 Se llevaron a cabo las reacciones para la detección de la presencia de un ADN de señal en presencia y ausencia de un ADN diana utilizando una secuencia cubierta de conversión de ADN nº 5 representada por la SEQ ID NO: 17 (CSC ADN nº 5). El ácido nucleico diana era el microARN humano hsa-miR-24 (SEQ ID NO: 6).

30 Las reacciones se llevaron a cabo con un volumen de reacción de 25 ml que contenía el tampón 2 de New England Biolabs (NEB) que tiene una concentración final de 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, pH 7,9. La endonucleasa de mellado que se utilizó en la reacción era Nb. BbvCI, que estaba presente a una concentración de 0,1 unidades/ml. La polimerasa utilizada en la reacción era el fragmento grande de la ADN polimerasa Bst que estaba presente a una concentración de 0,08 unidades/ml. Los dNTP estaban presentes con una concentración final de 200 µM cada uno. La CSC ADN nº 5 estaba presente en la reacción a una concentración final de 100 nM. Se utilizó una sonda de baliza molecular presente a una concentración final de 100 nM para detectar la generación del ADN de señal.

La CSC ADN nº 5 tiene la siguiente secuencia:

5'TGATAGCCCTGTACAATGCCTCAGCTTGTACAGGGCTATCACTGTTCCCTGCTGA
ACTGAGCCA3'-idT (SEQ ID NO.: 17)

40 La CSC ADN nº 5 incluye: una secuencia arbitraria (A) (SEQ ID NO: 14); un sitio de reconocimiento (B) de endonucleasa Nb.BbvCI (SEQ ID NO: 15) que se puede utilizar en la reacción de mellado; una secuencia (C) (SEQ ID NO: 18) complementaria de la secuencia arbitraria (A) (SEQ ID NO: 14); y una secuencia (D) (SEQ ID NO: 5) complementaria del ácido nucleico diana humano el microARN hsa-miR-24 (SEQ ID NO: 6). La CSC ADN nº 5 también tiene una modificación de timidina invertida en el extremo 3'.

50 Para detectar la presencia del ADN de señal generado después de la unión del microARN humano hsa-miR-24, el ADN diana (SEQ ID NO: 6) a la CSC ADN nº 5, se utilizó la siguiente baliza molecular:
5' (FAM)-CGATGATAGCCCTGTACAATGCCTCATCG-(DABCYL) 3' (SEQ ID NO: 31)

55 Los resultados de las reacciones utilizando la CSC ADN nº 5 para detectar el microARN humano hsa-miR-24 (SEQ ID NO: 6), el ADN diana, a diferentes concentraciones (10 nM, 1 nM, 0,1 nM, y 0,0 nM) se muestran en la Figura 8. En la Figura 8, el eje vertical muestra la intensidad de fluorescencia, y el eje horizontal muestra el tiempo en minutos. Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo a 37 °C a intervalos de 1 minuto durante 120 minutos utilizando un sistema CFX 96 de PCR de Bio-Rad.

Ejemplo 6

60 Se llevaron a cabo las reacciones para la detección de la presencia de un ADN de señal en presencia y ausencia de un ADN diana utilizando una secuencia cubierta de conversión de ADN nº 6 representada por la SEQ ID NO: 19 (CSC ADN nº 6). El ácido nucleico diana era el microARN humano hsa-miR-24 (SEQ ID NO: 6).

Las reacciones se llevaron a cabo con un volumen de reacción de 25 ml que contenía el tampón 2 de New England Biolabs (NEB) que tiene una concentración final de 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, pH 7,9. La endonucleasa de mellado que se utilizó en la reacción era Nb. BbvCI, que estaba presente a una concentración de 0,1 unidades/ml. La polimerasa utilizada en la reacción era el fragmento grande de la ADN polimerasa Bst que estaba presente a una concentración de 0,08 unidades/ml. Los dNTP estaban presentes con una concentración final de 200 µM cada uno. La CSC ADN nº 6 estaba presente en la reacción a una concentración final de 100 nM. Se utilizó una sonda de baliza molecular presente a una concentración final de 100 nM para detectar la generación del ADN de señal.

10 La CSC ADN nº 6 tiene la siguiente secuencia:

5'TGATAGCCCTGTACAATGCCTCAGCTACAGGGCTATCACTGTTCCCTGCTGAACT
GAGCCA3'-idT (SEQ ID NO.:19)

15 CSC ADN nº 6 (SEQ ID NO: 19) incluye: una secuencia arbitraria (A) (SEQ ID NO: 14); un sitio de reconocimiento (B) de endonucleasa Nb.BbvCI (SEQ ID NO: 15) que se puede utilizar en la reacción de mellado; una secuencia (C) (SEQ ID NO: 20) complementaria de la secuencia arbitraria (A) (SEQ ID NO: 14); y una secuencia (D) (SEQ ID NO: 5) complementaria del ácido nucleico diana humano el microARN hsa-miR-24 (SEQ ID NO: 6). La CSC ADN nº 6 también tiene una modificación de timidina invertida en el extremo 3'.

20 Para detectar la presencia del ADN de señal generado después de la unión del microARN humano hsa-miR-24, el ADN diana (SEQ ID NO: 6) a la CSC ADN nº 6, se utilizó la siguiente baliza molecular:
5' (FAM)-CGATGATAGCCCTGTACAATGCCTCATCG-(DABCYL) 3' (SEQ ID NO: 31)

25 Los resultados de las reacciones utilizando la CSC ADN nº 6 para detectar el ADN diana presente a diferentes concentraciones (10 nM, 1 nM, 0,1 nM, y 0,0 nM) se muestran en la Figura 9. En la Figura 9, el eje vertical muestra la intensidad de fluorescencia, y el eje horizontal muestra el tiempo en minutos. Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo a 37 °C a intervalos de 1 minuto durante 120 minutos utilizando un sistema CFX 96 de PCR de Bio-Rad.

30 Ejemplo 7

La Chlamydia es un parásito intracelular obligado, Gramnegativo, no móvil de células eucariotas. Los métodos de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para ensayar muestras biológicas en cuanto a la presencia o ausencia de los ácidos nucleicos que se originan a partir de las Chlamydia. Por ejemplo, se puede utilizar una CSC ADN como se describe en el presente documento, donde la secuencia (D) complementaria de un ácido nucleico diana comprende una secuencia (D) que es complementaria de un ácido nucleico que se origina de Chlamydia.

40 Las muestras pueden ser frotis de especímenes tomados del interior del cuello uterino, la vagina, uretra, o especímenes urinarios de los sujetos. La preparación de muestras se puede llevar a cabo utilizando un sistema de preparación de muestras m2000sp, que automatiza completamente la extracción del ácido nucleico a partir del espécimen y luego distribuye el ácido nucleico extraído en una placa de reacción óptica de 96 pocillos. Además del ácido nucleico extraído, también se puede distribuir lo siguiente en la placa de 96 pocillos: (1) La CSC ADN que tiene una secuencia (D) que es complementaria de un ácido nucleico que se origina de Chlamydia; (2) una polimerasa; y (3) una endonucleasa para el mellado del sitio (B) de la endonucleasa de la CSC ADN. Además, se pueden distribuir en la placa de 96 pocillos, tampones de reacción y otros reactivos (por ejemplo, dNTP y sondas de baliza molecular) según se necesite.

Ejemplo 8

50 La *Neisseria gonorrhoeae* es una especie de bacterias diplocócicas con forma de grano de café Gramnegativas responsables de la gonorrea infecciosa transmitida sexualmente. Los métodos de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para ensayar muestras biológicas en cuanto a la presencia o ausencia de los ácidos nucleicos que se originan a partir de *N. gonorrhoeae*. Por ejemplo, se puede utilizar una CSC ADN como se describe en el presente documento, donde la secuencia (D) complementaria de un ácido nucleico diana comprende una secuencia (D) que es complementaria de un ácido nucleico que se origina de *N. gonorrhoeae*.

60 Las muestras pueden ser frotis de especímenes tomados de la uretra masculina, el interior del cuello uterino, o la vagina, o especímenes urinarios de hombres y mujeres. La preparación de muestras se puede llevar a cabo utilizando un sistema de preparación de muestras m2000sp, que automatiza completamente la extracción del ácido nucleico a partir del espécimen y luego distribuye el ácido nucleico extraído en una placa de reacción óptica de 96 pocillos. Además del ácido nucleico extraído, también se puede distribuir lo siguiente en la placa de reacción óptica de 96 pocillos: (1) La CSC ADN que tiene una secuencia (D) que es complementaria de un ácido nucleico que se origina de *N. gonorrhoeae*; (2) una polimerasa; y (3) una endonucleasa para el mellado del sitio (B) de la endonucleasa de la CSC ADN. Además, se pueden distribuir en la placa de 96 pocillos, tampones de reacción y

otros reactivos (por ejemplo, dNTP y sondas de baliza molecular) según se necesite.

Ejemplo 9

5 El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus ARN de cadena sencilla, con un genoma de 9.500 nucleótidos. Los métodos de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para ensayar muestras biológicas en cuanto a la presencia o ausencia de los ácidos nucleicos que se originan a partir del VHC. Por ejemplo, se puede utilizar una CSC ADN como se describe en el presente documento, donde la secuencia (D) complementaria de un ácido nucleico diana comprende una secuencia (D) que es complementaria de un ácido nucleico que se origina de VHC.

10 Se pueden utilizar especímenes de suero y plasma (EDTA) humanos. La preparación de muestras se puede llevar a cabo utilizando un sistema de preparación de muestras m2000sp, que automatiza completamente la extracción del ácido nucleico a partir del espécimen y luego distribuye el ácido nucleico extraído en una placa de reacción óptica de 96 pocillos. Además del ácido nucleico extraído, también se puede distribuir lo siguiente en la placa de 96 pocillos:

15 (1) La CSC ADN que tiene una secuencia (D) que es complementaria de un ácido nucleico que se origina de VHC; (2) una polimerasa; y (3) una endonucleasa para el mellado del sitio (B) de la endonucleasa de la CSC ADN. Además, se pueden distribuir en la placa de 96 pocillos, tampones de reacción y otros reactivos (por ejemplo, dNTP y sondas de baliza molecular) según se necesite.

20 También se pueden detectar genotipos variados de VHC utilizando los métodos de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, se puede utilizar una CSC ADN como se ha descrito anteriormente, donde la secuencia (D) complementaria de un ácido nucleico diana se reemplaza con una secuencia (D) que es complementaria de un ácido nucleico que se origina del genotipo II del VHC. La preparación de muestras se puede llevar a cabo como se ha descrito anteriormente.

25

Ejemplo 10

El VHB es un virus ADN parcialmente de cadena doble de aproximadamente 3.200 pares de bases, y se pueden utilizar los métodos de acuerdo con la presente invención para detectar la presencia o ausencia de un ácido nucleico de VHB en una muestra. Por ejemplo, se puede utilizar una CSC ADN como se describe en el presente documento, donde la secuencia (D) complementaria de un ácido nucleico diana comprende una secuencia (D) que es complementaria de un ácido nucleico que se origina de VHB.

35 Se pueden utilizar especímenes de suero y plasma (EDTA) humanos. La preparación de muestras se puede llevar a cabo utilizando un sistema de preparación de muestras m2000sp, que automatiza completamente la extracción del ácido nucleico a partir del espécimen y luego distribuye el ácido nucleico extraído en una placa de reacción óptica de 96 pocillos. Además del ácido nucleico extraído, también se puede distribuir lo siguiente en la placa de 96 pocillos: (1) La CSC ADN que tiene una secuencia (D) que es complementaria de un ácido nucleico que se origina de VHB; (2) una polimerasa; y (3) una endonucleasa para el mellado del sitio (B) de la endonucleasa de la CSC ADN.

40 Además, se pueden distribuir en la placa de 96 pocillos, tampones de reacción y otros reactivos (por ejemplo, dNTP y sondas de baliza molecular) según se necesite.

Ejemplo 11

45 El virus-1 de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) es un retrovirus que produce el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Los métodos de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para detectar la presencia de ácido nucleico del VIH-1 en una muestra. Por ejemplo, se puede utilizar una CSC ADN como se describe en el presente documento, donde la secuencia (D) complementaria de un ácido nucleico diana comprende una secuencia (D) que es complementaria de un ácido nucleico que se origina de VIH-1.

50 La preparación de muestras se puede llevar a cabo utilizando un sistema de preparación de muestras m2000sp, que automatiza completamente la extracción del ácido nucleico a partir del espécimen y luego distribuye el ácido nucleico extraído en una placa de reacción óptica de 96 pocillos. Además del ácido nucleico extraído, también se puede distribuir lo siguiente en la placa de 96 pocillos: (1) La CSC ADN que tiene una secuencia (D) que es complementaria de un ácido nucleico que se origina de VIH-1; (2) una polimerasa; y (3) una endonucleasa para el mellado del sitio (B) de la endonucleasa de la CSC ADN. Además, se pueden distribuir en la placa de 96 pocillos, tampones de reacción y otros reactivos (por ejemplo, dNTP y sondas de baliza molecular) según se necesite.

60 Aunque la solicitud se ha descrito en referencia a ciertos aspectos y realizaciones, los expertos en la técnica entenderán que se pueden hacer cambios en la divulgación proporcionada en el presente documento, y que se pueden sustituir por equivalentes sin alejarse del alcance de la divulgación. En consecuencia, la solicitud no debería limitarse a aspectos y realizaciones particulares desvelados, sino que se debería entender y apreciar que incluye todos los aspectos y realizaciones que se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

65

TABLA 1

ES 2 754 251 T3

Conversión DNA	Tallo/lazo	Señal* a 120 minutos utilizando 10 nM de diana (Relación señal/diana)	Señal* a 120 minutos utilizando 1 nM de diana (Relación señal/diana)	Señal* a 120 minutos utilizando 0,1 nM de diana (Relación señal/diana)
USC DNA nº 1 (SEQ ID NO: 7)	NA	10,0	6,6	5,7
CSC DNA nº 1 (SEQ ID NO: 1)	Tallo 18 / Lazo 13	10,0	43,7	48,4
CSC DNA nº 2 (SEQ ID NO: 9)	Tallo 21 / Lazo 10	10,0	38,0	47,4
CSC DNA nº 3 (SEQ ID NO: 11)	Tallo 11 / Lazo 21	10,0	15,6	36,3
CSC DNA nº 4 (SEQ ID NO: 13)	Tallo 18 / Lazo 7	10,0	98,4	116,4
CSC DNA nº 5 (SEQ ID NO: 17)	Tallo 16 / Lazo 9	10,0	95,3	169,9
CSC DNA nº 6 (SEQ ID NO: 19)	Tallo 13 / Lazo 12	10,0	95,0	130,6

*Señal fluorescente por encima del fondo. El fondo se define como la señal a 0 nM de ácido nucleico diana

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Komiya, Ken Komori, Makoto Yoshimura, Tohru Abbott Japan Co., Ltd., Tokyo Institute of Technology,
<120> Secuencia cubierta de conversión de ADN y métodos de detección
<130> 27486US01
10 <160> 31
<170> PatentIn versión 3.5
15 <210> 1
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20 <220>
<223> Sintética
<220>
25 <221> misc_feature
<222> (72)..(72)
<223> 3' - Timidina invertida
<400> 1
tgatagccct gtacaaatgc tgctcagaga tccattgtac agggetatca ctgttcctgc 60
30 tgaactgagc ca 72
<210> 2
<211> 18
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Sintética
40 <400> 2
tgatagccct gtacaaatg 18
<210> 3

ES 2 754 251 T3

<211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintética

<400> 3
 ctgctcagag atc 13

10

<210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Sintética

<400>4
 cattgtacag ggctatca 18

20

<210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Sintética

30

<400> 5
 ctgttcctgc tgaactgagc ca 22

35

<210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Sintética

<400> 6
 tggctcagtt cagcaggaac ag 22

45

<210>7
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Sintética

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (54)..(54)

55

<223> 3' - Timidina invertida

<400> 7
 tgatagccct gtacaatgct gctcagagat cctgttcct gctgaactga gccca 54

60

<210> 8
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

<220>

ES 2 754 251 T3

<223> Sintética
<220>

5 <221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Modificación con FAM del extremo 5'

<220>

10 <221> misc_feature
<222> (33)..(33)
<223> Modificación con DABCYL del extremo 3'

<400> 8
15 cgcgatgata gccctgtaca atgctgcttc gcg 33

<210> 9
<211> 74
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(74)
<223> 3' - Timidina invertida

30 <400> 9

tgatagccct gtacaatgct gctcagagat ccagcattgt acagggctat cactgttcct 60

gctgaactga gccca 74

<210> 10
35 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Sintética

<400> 10
agcattgtac agggctatca 20

45 <210> 11
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Sintética

<220>
55 <221> misc_feature
<222> (65)..(65)
<223> 3' - Timidina invertida

<400> 11

tgatagccct gtacaatgct gctcagagat cccagggcta tcactgttcc tgctgaactg 60

60 agcca 65

ES 2 754 251 T3

<210> 12
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 12
 10 cagggctatc a 11
 <210> 13
 <211> 65
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (65)..(65)
 <223> 3' - Timidina invertida
 25 <400> 13
 tgatagccct gtacaatgcc tcagccattg tacagggcta tcaactgttcc tgctgaactg 60
 agcca 65
 30 <210> 14
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sintética
 <400> 14
 40 tgatagccct gtacaatg 18
 <210> 15
 <211> 7
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sintética
 <400> 15
 50 cctcagc 7
 <210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 60 <400> 16
 cattgtacag ggctatca 18
 <210> 17
 <211> 63

ES 2 754 251 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (63)..(63)
 10 <223> 3' - Timidina invertida
 <400> 17
 tgatagccct gtacaatgcc tcagcttgta cagggtatc actgttcctg ctgaactgag 60
 cca 63
 15 <210> 18
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sintética
 <400> 18
 25 ttgtacaggg ctatca 16
 <210> 19
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (60)..(60)
 <223> 3' - Timidina invertida
 40 <400> 1
 tgatagccct gtacaatgcc tcagctacag ggctatcact gtcctgctg aactgagcca 60
 <210> 20
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sintética
 <400> 20
 50 tacagggcta tca 13
 <210> 21
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(84)
 <223> miR-17
 60

ES 2 754 251 T3

	<400> 21	
	gucagaauaa ugucaaagug cuuacagugc agguagugau augugcaucu acugcaguga	60
	aggcacuugu agcauuauagg ugac	84
5	<210> 22 <211> 82 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(82) <223> miR-19	
15	<400> 22	
	gcaguccucu guuaguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaaucua	60
	ugcaaaacug augguggccu gc	82
20	<210> 23 <211> 72 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(72) <223> miR-21	
30	<400> 23	
	ugucggguag cuuauacagac ugauguugac uguugaaucu cauggcaaca ccagucgaug	60
	ggcugucuga ca	72
35	<210> 24 <211> 65 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(65) <223> miR-155	
	<400> 24	
	cuguuaaugc uauucgugau agggguuuuu gccuccaacu gacuccuaca uauuagcauu	60
45	aacag	65
50	<210> 25 <211> 96 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(96) <223> miR-569	
	<400> 25	

ES 2 754 251 T3

	gguaauuguua gauuaauuuu gugggacauu aacaacagca ucagaagcaa caucagcuuu	60
	aguuuaugaa uccuggaaag uuaagugacu uuauuu	96
5	<210> 26 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(22) <223> hsa-miR-24	
15	<400> 26 uggcucaguu cagcaggaac ag 22	
20	<210> 27 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(23) <223> hsa-miR-107	
30	<400> 27 agcagcauug uacagggcua uca 23	
35	<210> 28 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(23) <223> hsa-miR-221	
45	<400> 28 agcuacauug ucugcugggu uuc 23	
50	<210> 29 <211> 84 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(84) <223> hsa-miR-500	
60	<400> 29 gcucCCCCcuc ucuaauccuu gcuaccuggg ugagagugcu gucugaaugc aaugcaccug	60
60	ggcaaggauu cugagagcga gagc	84
60	<210> 30 <211> 81 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 754 251 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(81)
 <223> hsa-miR-106a
 5
 <400> 30
 ccuuggccau guaaaagugc uuacagugca gguagcuuuu ugagaucuac ugcaauguaa 60
 gcacuucuaa cauuaccaug g 81
 10 <210> 31
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (1)..(1)
 <223> Modificación con FAM del extremo 5'
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (29)..(29)
 <223> Modificación con DABCYL del extremo 3'
 <400> 31
 cgatgatagc cctgtacaat gcctcatcg 29
 30

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con:
 - 5 un oligonucleótido horquillado que comprende en la dirección 5' a 3', una primera secuencia arbitraria, un sitio de reconocimiento de la endonucleasa, una secuencia complementaria de dicha primera secuencia arbitraria, una secuencia complementaria del extremo 3' de un ácido nucleico diana, una modificación del extremo 3' que evita el inicio de reacciones de extensión no específicas a partir del extremo 3' del oligonucleótido horquillado;
 - 10 una polimerasa; y
una endonucleasa para una reacción de mellado;
para formar una mezcla de reacción;
permitir que la secuencia del extremo 3' del ácido nucleico diana se hibride con el oligonucleótido horquillado en la secuencia complementaria del extremo 3' del ácido nucleico diana;
 - 15 iniciar la replicación por desplazamiento de cadena en el extremo 3' del ácido nucleico diana por la ADN polimerasa generando una secuencia de extensión de cadena doble que incluye un sitio de reconocimiento de la endonucleasa de doble cadena
y una secuencia de oligonucleótido de señal que es complementaria de la primera secuencia arbitraria;
mellar la secuencia de extensión de doble cadena mediante la endonucleasa para generar una secuencia de oligonucleótido de señal que se desplaza desde la horquilla mediante la ADN polimerasa; y
 - 20 detectar el ADN de señal, donde la presencia del ADN de señal detecta la presencia del ácido nucleico diana en la muestra.
2. El método de la reivindicación 1, donde dicho método se lleva a cabo a una temperatura constante con posibles fluctuaciones de ± 2 °C o ± 5 °C.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 donde dicho método se lleva a cabo a una temperatura de desde 20 °C a 42 °C.
- 30 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 donde dicho método se lleva a cabo a una temperatura de 37 °C.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 donde dicha diana es un microARN.
- 35 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 donde el oligonucleótido comprende adicionalmente una modificación en el extremo 5', en el sitio de reconocimiento de la endonucleasa, o en ambos, el extremo 5' y el sitio de reconocimiento de la endonucleasa.
- 40 7. Un oligonucleótido que comprende, en la dirección 5' a 3', una primera secuencia arbitraria, un sitio de reconocimiento de la endonucleasa, una secuencia complementaria de dicha primera secuencia arbitraria, una secuencia complementaria del extremo 3' de un ácido nucleico diana, una modificación del extremo 3' que evita el inicio de reacciones de extensión no específicas a partir del extremo 3' del oligonucleótido horquillado, donde dicha primera secuencia arbitraria y dicha secuencia complementaria de dicha primera secuencia arbitraria se hibridan para formar una estructura horquillada, y dicho sitio de reconocimiento de la endonucleasa se localiza en el lazo de dicha estructura horquillada.
- 45 8. El oligonucleótido de la reivindicación 7, donde dicho sitio de reconocimiento de la endonucleasa comprende una secuencia que es complementaria de una secuencia que está mellada por una endonucleasa.
- 50 9. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 7-8 donde dicha secuencia complementaria del extremo 3' de un ácido nucleico diana es complementaria de un microARN.
10. El oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9 donde el oligonucleótido comprende adicionalmente una modificación en el extremo 5', en el sitio de reconocimiento de la endonucleasa, o en ambos, el extremo 5' y el sitio de reconocimiento de la endonucleasa.
- 55 11. Una composición para la detección de un ácido nucleico en una muestra, comprendiendo dicha composición:
 - 60 un oligonucleótido que tiene una estructura horquillada, donde el oligonucleótido comprende en la dirección 5' a 3', una primera secuencia arbitraria, un sitio de reconocimiento de endonucleasa, una secuencia complementaria de dicha primera secuencia arbitraria, una secuencia complementaria del extremo 3' de un ácido nucleico diana, y una modificación en el extremo 3' que evita el inicio de reacciones de extensión no específicas desde el extremo 3' del oligonucleótido horquillado, donde al menos una parte de dicha primera secuencia arbitraria y al menos una parte de dicha secuencia complementaria de dicha primera secuencia arbitraria se hibridan para formar dicha estructura horquillada;
 - 65 una polimerasa; y

una endonucleasa para la reacción de mellado.

12. La composición de la reivindicación 11 donde dicha secuencia complementaria de dicho ácido nucleico diana se une a un microARN.

5

FIGURA 1

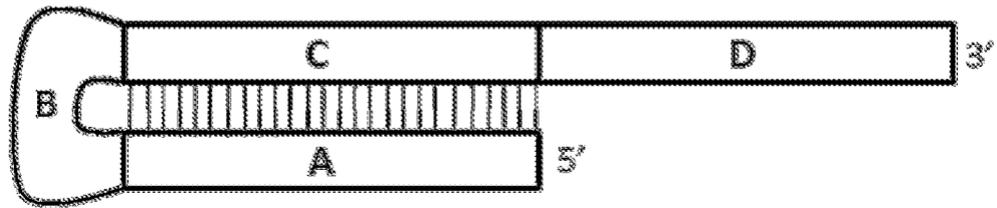


FIGURA 2

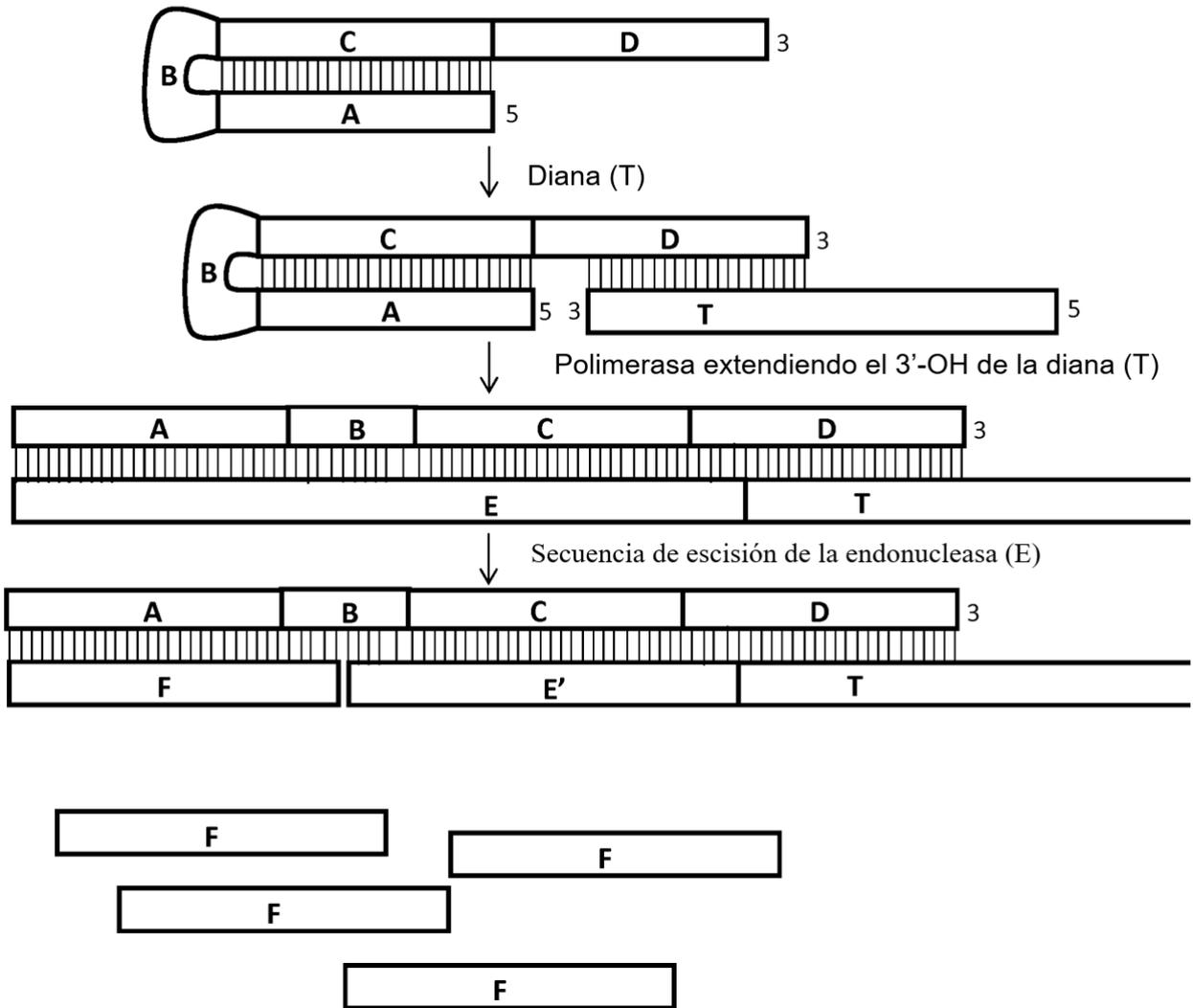


FIGURA 3

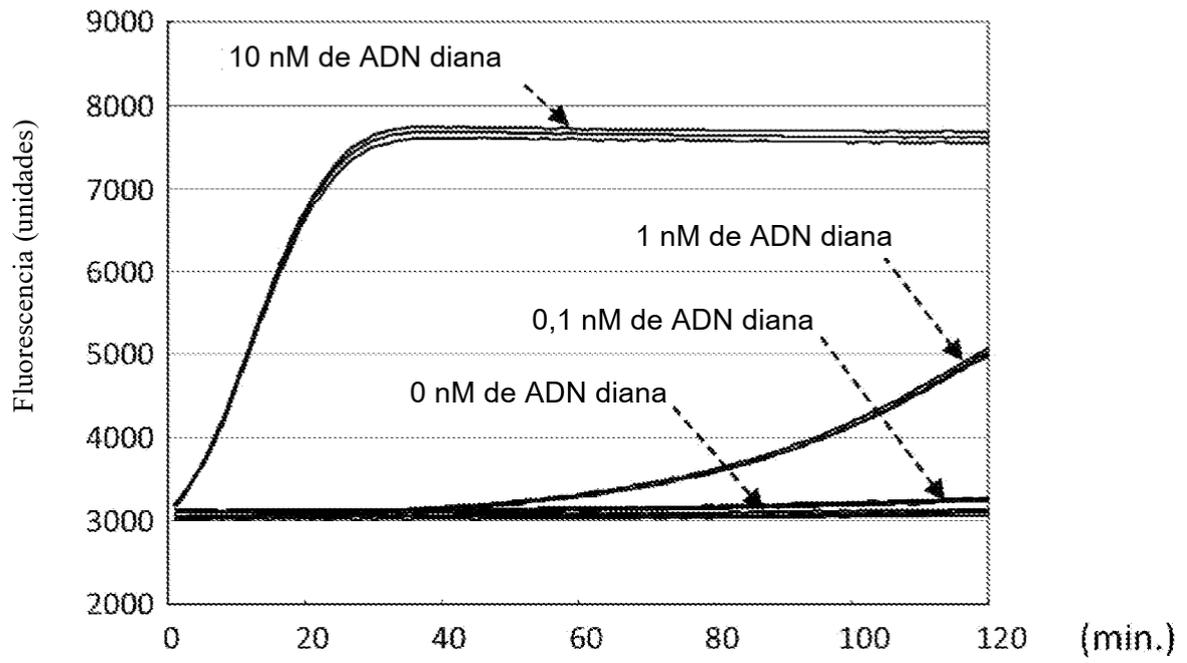


FIGURA 4

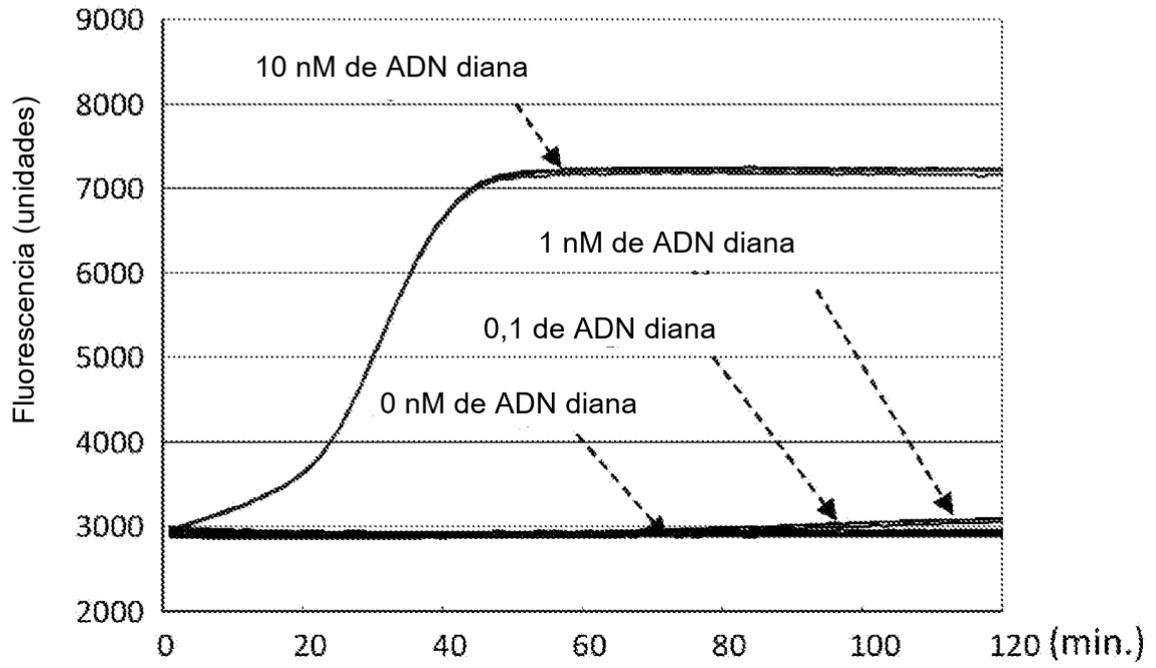


FIGURA 5

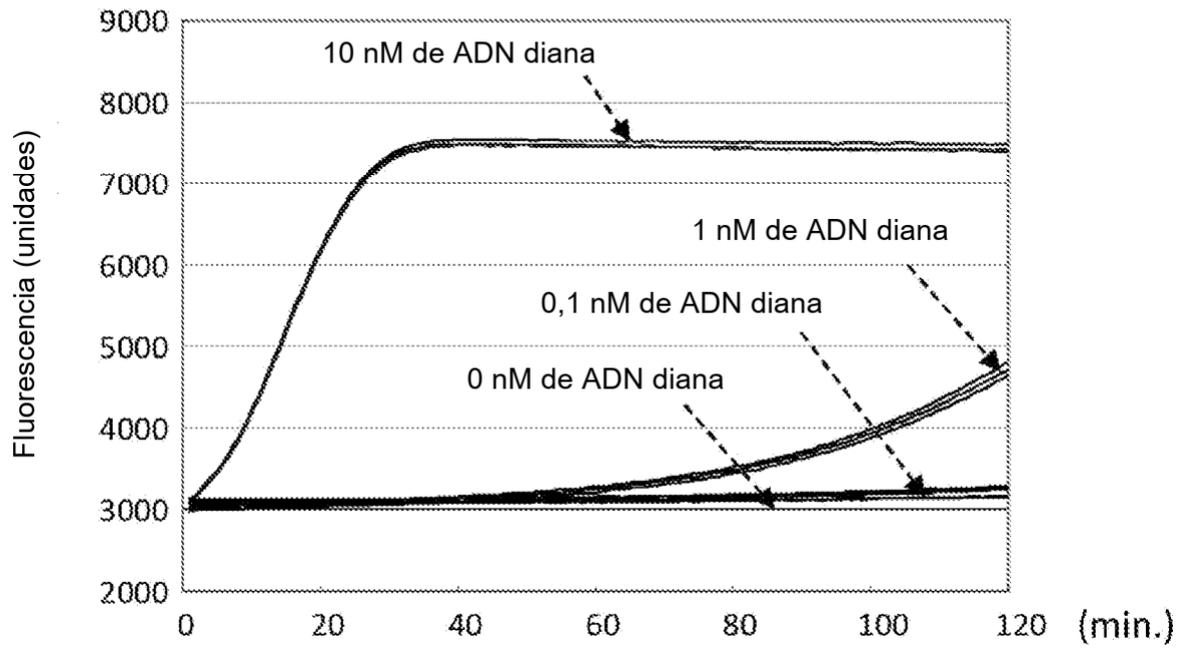


FIGURA 6

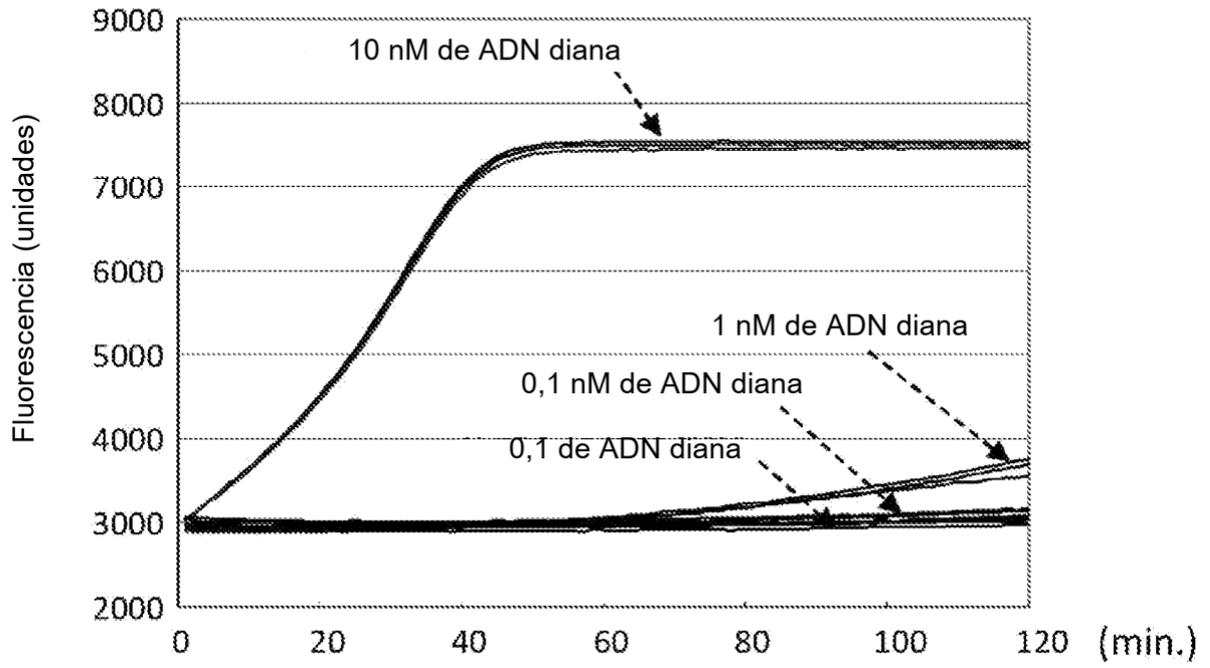


FIGURA 7

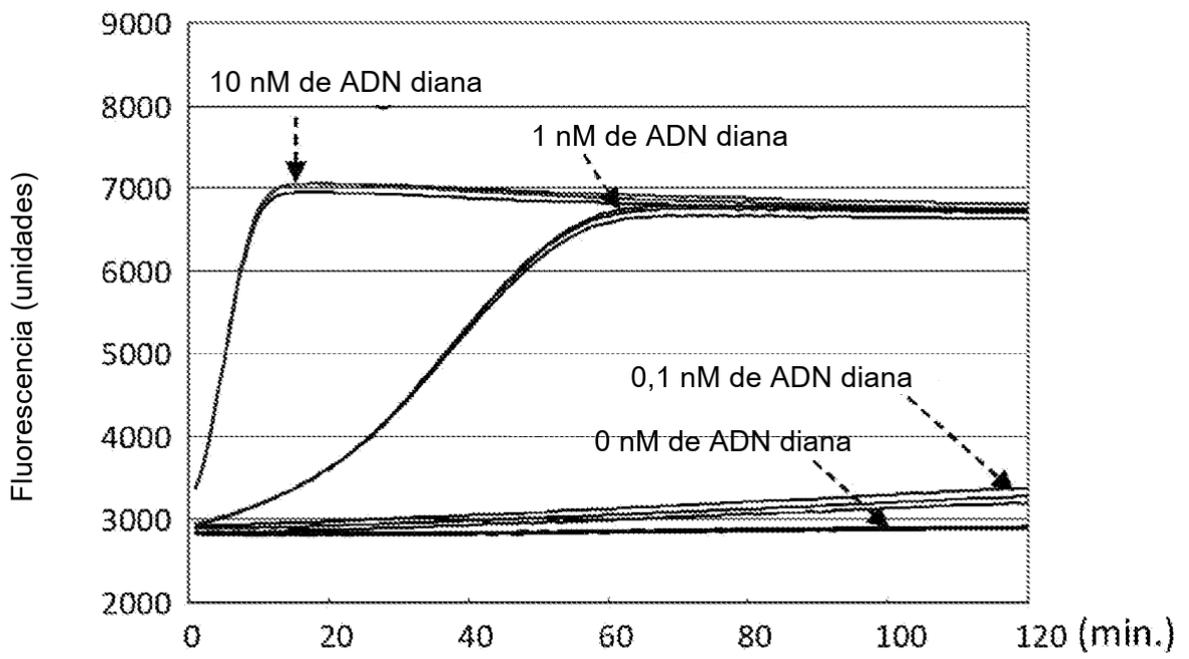


FIGURA 8

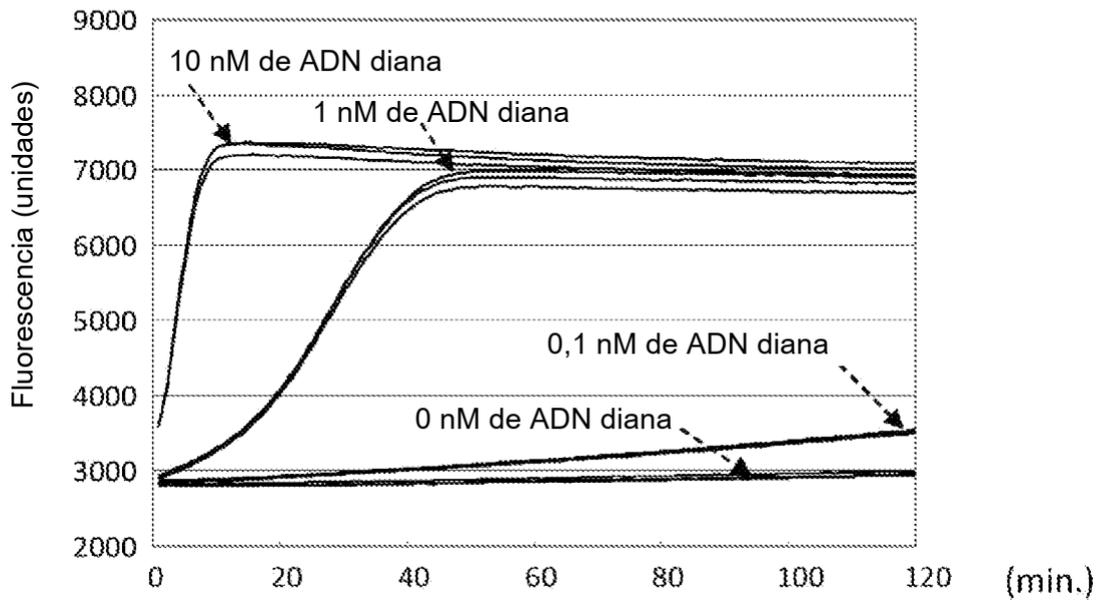


FIGURA 9

